

Remodelace genomu během prvního buněčného dělení embryogeneze

I. Barnetova, abstrakt dizertační práce

Spermie obsahuje vysoce kompaktní genom. Tato kompaktnost je zprostředkována protaminy. Během oplození jsou protaminy spermie nahrazeny histony z cytoplazmy oocyty. Vedle výměny proteinů nastává i epigenetická remodelace. Mezi nejvíce studované epigenetické remodelace patří aktivní demethylace paternálního prvojádra. Tento jev byl pozorován u některých savců (myš, krysa, opice). Naopak u jiných druhů savců (ovce) aktivní demethylace prokázána nebyla. U některých druhů byly dokonce pozorovány obě varianty (prase, člověk, koza, králík).

Práce se zaměřuje na modelový druh prasete a pokouší se objasnit důvody rozporupných výsledků aktivní demethylace paternálního prvojádra pozorovaných u prasete. V této práci byly prověřeny tři možné faktory - technika produkce embryí, faktory spermie a kvalita oocytů. V první části práce byly porovnány zygoty vytvořené pomocí IVF (klasické *in vitro* oplození) a ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie). Epigenetická remodelace prvojader byla analyzována pomocí nepřímé imunofluorescence. Mezi zygotami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. Paternální genom nepodléhal aktivní demethylaci ani v jednom typu embryí. Značení pomocí anti-H3/K9-me2 (dimethylace na lysinu 9 histonu 3) ukázalo pozitivní signál v obou prvojádrech přibližně v polovině případů.

Druhá část práce se zaměřuje na faktory spermie. Za tímto účelem byla použita metoda iICSI (mezidruhovú intracytoplazmatická injekce spermie), která umožňuje experimentálně oddělit maternální a paternální podíl v zygotě. Myší oocyty byly injikovány kančími a lidskými spermii, dále oocyty prasete byly injikovány spermii myší. Ve všech zmíněných kombinacích došlo k vytvoření paternálního prvojádra. Paternální genom prasete a člověka byl v oocyty myší aktivně demetylován. Naproti tomu v oocyty prasete nedošlo k demethylaci paternálního genomu myší. Z výsledků vyplývá, že remodelace paternálního genomu je ovlivněna především cytoplazmou oocyty. Navíc spermie prasete, které nepodléhají demethylaci v prasečím oocyty, podléhají aktivní demethylaci v oocyty myší.

Třetí část práce se zaměřuje na kvalitu oocytů. Za tímto účelem byla srovnávána embrya odvozená z ovulovaných a *in vitro* maturovaných oocytů myší a prasete (metoda ICSI a iICSI). Rozdílná kvalita oocytů byla patrná u obou druhů, a to především v aktivační schopnosti oocyty. V případě myší *in vitro* maturované oocyty nebyly schopny vytvořit paternální prvojádru kančího původu. Ovulované oocyty toto prvojádru vytvářely bez problémů. Podobně *in vitro* maturované oocyty prasete vytvářely paternální prvojádru myšího původu pouze po dodatečné aktivaci oocyty elektrickým pulzem, zatímco ovulované oocyty prasete paternální prvojádru myšího původu vytvořily i bez dodatečné aktivace. V oblasti epigenetické remodelace byl patrný pouze malý rozdíl. Vnitrodruhovú zygoty myší odvozené z *in vitro* maturovaných oocytů se lišily od zygot z ovulovaných oocytů pouze v míře DNA demethylace 12 hpf (hodin po oplození). V případě oocytů prasete nebyl pozorován žádný rozdíl v epigenetické remodelaci mezi zygotami. Navíc aktivní demethylace paternálního prvojádra nebyla pozorována v žádném typu embryí prasete, a to ani ve vnitrodruhovú zygotách vytvořených intracytoplazmatickou injekcí spermie do ovulovaného oocyty.

Z našich výsledků vyplývá, že technika, faktory spermie a ani kvalita oocyty zásadně neovlivňují výslednou epigenetickou remodelaci zygoty. Předpokládáme, že důvod rozporupných výsledků pozorovaných u prasete má mnohem komplexnější charakter. Zdá se, že příčina není v kvalitě oocyty, jak je často prezentováno, ale v dalších, dosud neznámých, faktorech.